



تغییر ژن‌های ESR و IGFBP1 بافت تخمدان موش‌های مدل آندومتریوز متعاقب یک دوره تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین E

فاطمه شهیدیان اکبر؛ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران

پروین فرزانگی؛ دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران (نونیستنده مستول) parvin.farzanegi@gmail.com

هاجر عباسزاده؛ استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

شنا،

E ویتامین

ژن IGFBP1

آندومتریوز

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۶

زمینه و هدف: هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی تغییرات بیان ژن ESR و IGFBP1 موش‌های مدل آندومتریوز به دنبال یک دوره تمرین هوایی و مصرف ویتامین E بود.

روش کار: در این تحقیق تجربی ۲۵ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار پس از ایجاد مدل آندومتریوز به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم، آندومتریوز، آندومتریوز+ویتامین E، آندومتریوز+تمرین، آندومتریوز+تمرین+E ویتامین E دسته‌بندی شدند. میزان مصرف ویتامین، ۲۰۰ kg/mg به ازای وزن بدن هر موش بوده و برنامه تمرین شنا به مدت ۸ هفته پنج روز و هر روز به مدت ۳۰ دقیقه بود. جهت تجهیزه و تحیلی داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده گردید.

یافته‌ها: یافته‌های احکمی از آن بود که بیشترین بیان ژن ESR و IGFBP1 در گروه آندومتریوز+تمرین+ویتامین E و کمترین سطوح آن در گروه آندومتریوز مشاهده شد. مقایسات بین گروهی نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان گروه آندومتریوز با گروه‌های آندومتریوز+تمرین، آندومتریوز+ویتامین E و آندومتریوز+تمرین+ویتامین E در بیان ژن ESR وجود دارد ($p=0.00016$ ، $p=0.026$ ، $p=0.035$ ، $p=0.046$ ، به ترتیب). همچنین اختلاف معنی‌داری میان گروه آندومتریوز با گروه‌های آندومتریوز+تمرین و آندومتریوز+تمرین+ویتامین E نیز بین گروه‌های آندومتریوز+تمرین+ویتامین E با گروه‌های آندومتریوز+تمرین و آندومتریوز+ویتامین E در بیان ژن IGFBP1 مشاهده شد ($p=0.00019$ ، $p=0.0002$ ، $p=0.022$ ، $p=0.046$ ، به ترتیب).

نتیجه گیری: به طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که تغییر مولکول‌های کلیدی یا مسیرهای سیگنالی و بیان ژن در فرایند آندومتریوز می‌تواند باعث بهبود سطح این بیماری گردد و انجام فعالیت ورزشی منظم هوایی و نیز مصرف هم‌زمان ویتامین E در مهار این بیماری و بهبود سطح این بیماری کمک شایانی می‌کند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Shahidian Akbar F, Farzanegi P, Abbaszadeh H. Evaluation of ESR and IGFBP1 genes of ovarian tissue of endometriosis model mice after a period of regular exercise and vitamin E intake. Razi J Med Sci. 2020;27(3):38-48.

* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

Evaluation of ESR and IGFBP1 genes of ovarian tissue of endometriosis model mice after a period of regular exercise and vitamin E intake

Fatemeh Shahidian Akbar, PhD student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Parvin Farzanegi , Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran (*Corresponding author) parvin.farzanegi@gmail.com

Hajar Abbaszadeh, Assistant Associate Professor, Exercise Physiology Department, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the ESR and IGFBP1 gene expression changes in endometriosis model rats following a period of aerobic exercise and vitamin E intake.

Methods: In this experimental study, 25 adult Wistar rats were randomly divided into 5 groups of healthy control, endometriosis, endometriosis+ exercise, endometriosis+ vitamin E, endometriosis+ vitamin E+ exercise after creating endometriosis model. Vitamin intake was 200 kg/mg per rat body weight and swimming program was 8 weeks, five days a week for 30 minutes each day. One-way ANOVA test were used for data analysis.

Results: The results showed that the highest expression of ESR and IGFBP1 gene was observed in endometriosis+ exercise+ vitamin E group and the lowest levels in endometriosis group. Intergroup comparisons showed that there was a significant difference between endometriosis and endometriosis+exercise, endometriosis+vitamin E and endometriosis+exercise+vitamin E groups in ESR gene expression ($p=0.0016$, $p=0.026$, $p=0.0335$, respectively). There was also a significant difference between endometriosis group with endometriosis+exercise and endometriosis+exercise+vitamin E and also between endometriosis+exercise+ vitamin E groups with endometriosis+exercise and endometriosis+vitamin E groups in IGFBP1 gene expression ($p=0.0019$, $p=0.0446$, $p=0.002$, $p=0.0222$, respectively).

Conclusion: In general, the results of this study indicated that alteration of key molecules or signaling pathways and gene expression in endometriosis can improve the level of this disease and regular aerobic exercise as well as concomitant use of Vitamin E can help prevent and improve this disease.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

Swimming,

Vitamin E,

Insulin-Like Growth

Factor Binding Protein 1,

Endometriosis

Received: 04/01/2020

Accepted: 25/04/2020

Cite this article as:

Shahidian Akbar F, Farzanegi P, Abbaszadeh H. Evaluation of ESR and IGFBP1 genes of ovarian tissue of endometriosis model mice after a period of regular exercise and vitamin E intake. Razi J Med Sci. 2020;27(3):38-48.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.



مقاله پژوهشی

مقدمه

می شود (۸). نتایج به دست آمده از مطالعات همبستگی (Genome Wide Association Study -GWAS) ژنوم (Genome Wide Association Study -GWAS) حاکی از وجود ارتباط میان پلی مورفیسم های متعدد و شناس ابتلا به این بیماری می باشد (۹). ESR گیرنده عمده در رحم بزرگ سالان است و قسمت بیشتر اثرات استروژن از طریق این گیرنده اعمال می شود. قسمت اعظم اثرات استروژن همچون تحریک پرولیفراسیون و همچنین تحریک بیان گیرنده پروژسترون توسط این گیرنده اعمال می شوند (۱۰). در پژوهشی توسط ایکسو و همکاران ارتباط بین پلی مورفیسم ژن ESR و اندومتریوز مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج حاصل نشان دهنده وجود ارتباط معنادار میان این پلی مورفیسم و استعداد به اندومتریوز بود (۱۱). از سوی دیگر گزارش شده که در طی پیشرفت آندومتریوز، آندومتر با اختلال در تنظیم تعدادی از ژن های پاسخ دهنده پروژسترون مانند پروتئین-1 متصل به عامل رشد انسولینی به عمل پروژسترون مقاوم می شود. نشان داده شده که IGFBP-1 یک نشانگر اصلی برای تنظیمات احتمالی تجزیه مجدد (رمزگشایی) سلول استروم در حیوانات می باشد. برای مثال، سلول های استرومای آندومتر جدا شده از بابون ها با آندومتریوز افزایش بیان IGFBP-1 پس از درمان تجزیه مجدد (رمزگشایی) را نشان داده است، و این نشانگر پاسخ بیش از حد به تجزیه مجدد (رمزگشایی) است. در مقابل، سلول های استرومای آندومتر انسان از زنان بیمار ترشح IGFBP-1 را کاهش داده است. هر دو این مطالعات نشان می دهد که یک پاسخ تجزیه مجدد (رمزگشایی) تغییریافته در سلول های استرومای آندومتر از بیماران آندومتریوم وجود دارد (۱۲). غلظت این پروتئین در زنان بالاتر از مردان است (۱۳). نتایج تحقیقات نشان می دهد که بین ESR و سطوح IGFBP1 در وضعیت التهابی ارتباط وجود دارد (۱۴).

درمان های مختلف برای بیماری اندومتریوز برسی شده است. برای مثال، برخی مطالعات گزارش کرده اند که درمان های سنتی، می تواند پیامدهای فیزیولوژیک و روانی منفی برای مبتلایان به این بیماری همراه داشته

اندومتریوز یک بیماری مزمن و یک علت شایع درد مزمن لگنی است که در ۵-۱۵ درصد زنان سنین باروری رخ می دهد (۱). با یک نگاه وسیع تر، اندومتریوز یک بیماری سیستمیک اندوکرین، ایمونولوژیک و گوارشی است (۲). هنوز مشخص نیست چرا در برخی زنان، نشانه های شدید بیماری بروز می کند و برخی دیگر بدون علامت باقی می مانند و در ضمن علت بیماری حتی با وجود درد شدید ممکن است تا چند سال تأخیر بیفت (۳). در پاتوژن بیماری اندومتریوز ژن های متعددی در ارتباط با این بیماری شناسایی شده اند، و از میان آن ها ژن های مربوط به گیرنده های هورمون های جنسی از اهمیت بیشتری در این زمینه برخوردار می باشند. از آنجا که زنان به طور عمده در سنین باروری به این بیماری مبتلا می شوند و بعد از یائسگی و برداشت تخدمان ها میزان ابتلا به آن کاهش می یابد؛ از این رو به نظر می رسد این بیماری با استروژن مرتبط باشد (۴).

تنظیم کننده اصلی عملکرد رحم استروژن ها و پروژسترون هستند که از طریق گیرنده های هسته ای خاص خود عمل می کنند (۵). پیامرسانی سلولی استروژن ها از طریق گیرنده استروژن یعنی گیرنده استروژن آلفا و گیرنده استروژن بتا صورت می گیرد. هر دو گیرنده استروژن متعلق به خانواده ای از فاکتورهای رونویسی به نام خانواده گیرنده هسته ای می باشند که در آندومتر بیان می شوند ولی میزان بیان آن ها در فازهای قاعده ای متفاوت است (۶). با توجه به اینکه پیامرسانی سلولی استروژن ها توسط گیرنده استروژن یعنی ESR صورت می گیرد، از این رو می توان از این ژن داشته و طول آن حدود ۴۵۰ کیلوباز است (۷). این ژن گذکننده پروتئین گیرنده استروژن آلفا می باشد که این محصول ژنی موجب تحریک رشد سلول های آندومتر

و IGFBP1 مورد مطالعه قرار داده باشد، انجام نشده است. از طرفی پژوهشی که به تمام عوامل خطرزای اندومتریوز و سازوکارهای بهبود آن در بافت تخدمان توجه کرده باشد، وجود ندارد. از این‌رو در پژوهش حاضر تلاش خواهد شد تا آثار یک دوره تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین E بر تغییرات ژن‌های ESR و IGFBP1 بافت تخدمان موش‌های مدل اندومتریوز مورد بررسی قرار گیرد.

روش کار

در این تحقیق تجربی تعداد ۲۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی $۲۰۲/۸۵ \pm ۱۵/۶۲$ گرم از انسستیتو پاستور خردباری ۲۲ $\pm ۱/۴$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات نگهداری شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انسستیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پژوهشکی انجام شد (۲۲).

حیوانات از غذای پلت و آب که به صورت آزاد در اختیار قرار می‌گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزن‌کشی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داشت به منظور ایجاد مدل اندومتریوزیز، ابتدا رت‌های بالغ با استفاده از کتابمین و زیالازین بیهوش شدند. پس از آن، ناحیه شکمی در طرف راست با بتادین تمیز شد. سپس با استفاده از تیغ بیستوری شکافی در پوست ناحیه پهلو در بخش لگنی داده شد. پس از باز کردن عضله شکمی و ناحیه صفاق، ابتدا، بافت تخدمانی به همراه بخشی از بافت لوله رحمی برداشته شد. سپس در داخل ظرف استریل با یک سی‌سی PBS (Buffer Solution Phosphate) قرار داده شد. سپس هر بافت به یک قطعه یک در یک میلی‌متر بریده شد. قطعات بافتی که برای هر موش ۴ قطعه بود به ناحیه دیواره عضلانی لگنی سمت راست، به ناحیه صفاق شکمی، به ناحیه عضله قدامی دیواره شکمی و چربی اطراف تخدمان پیوند زده شدند. سپس ناحیه جراحی شده بخیه شدند و موش‌ها به قفس مربوطه انتقال داده

باشد. دیده شده که این درمان‌ها کیفیت زندگی، ظرفیت هوایی افراد بیمار را به طور کامل تحت تأثیر قرار می‌دهد. پژوهشگران بر این باورند که فعالیت ورزشی ممکن است از طریق سازوکارهایی بتواند درد ناشی از بیماری را کاهش دهد (۱۵). برخی از این سازوکارها به وزن بدن، شاخص توده بدن، عوامل رشد شبه انسولینی و پروتئین‌های متصل به آن، انسولین، هورمون جنسی، استردادیول، استروژن و بهبود سطح رادیکال‌های آزاد و تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی بهویژه بهبود سطوح عوامل اکسایشی مربوط است (۱۶). آثار فعالیت بدنی بر سطوح استراحتی IGFBP1 و ESR به طور کامل مشخص نشده است. مطالعات نشان داده است که فعالیت بدنی، افزایش در سطوح IGFBP1 را تحریک می‌کند (۱۶ و ۱۷). اگرچه در تعدادی از مطالعات این افزایش در سطوح IGFBP1 به دنبال فعالیت بدنی مشاهده نشده است (۱۸ و ۱۹)، ولیکن باید توجه داشت که اثر فعالیت بدنی بر این دو پروتئین در وضعیت بیماری اندومتریوز تاکنون صورت نگرفته و مکانیسم تغییرات آن‌ها نیز به طور کامل مشخص نیست. نتایج تحقیقات ورزشی بیانگر آن است که تغییرات سطوح IGF در گردش خون با مجموعه‌ای پروتئین‌های اتصالی IGFBP1 تا ۶ پیوند می‌خوردو فعالیت زیستی و دسترسی زیستی آن را تنظیم می‌کنند. IGFBP1 یک تنظیم‌کننده موضعی فعالیت IGF با تنظیم پویایی سریع است و توسط انسولین تنظیم کاهشی می‌یابد (۱۵). با این وجود تغییرات سطوح IGFBP1 و ESR در وضعیت التهابی به طور کامل مشخص نیست. از سوی دیگر، شواهد نشان می‌دهد که بیماران مبتلا به اندومتریوز دارای سطوح بالاتر استرس اکسایشی و سایتوکین‌های التهابی و پیش‌التهابی می‌باشند (۲۰). محققان جهت کاهش این علائم، افزایش روند بهبودی و کیفیت زندگی بیماران، مطالعات انجام مداخلات مناسب را مورد تأکید قرار دارند. مطالعات نشان دادند مصرف مکمل‌های غذایی و ویتامین‌هایی نظیر ویتامین E مقدار استروژن را در بدن کنترل می‌کنند و به کاهش علائم اندومتریوز کمک می‌کنند (۲۱). اگرچه به تازگی پژوهش‌هایی فعالیت ورزشی و مکمل‌های ویتامینی در وضعیت بیماری‌های التهابی انجام شده است، اما پژوهشی که آثار فعالیت ورزشی و مصرف ویتامین E بر تغییرات ژن‌های ESR را مربوطه انتقال داده

جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase Ifermentas قرار گرفت. علاوه بر این، جهت ارزیابی یکپارچگی RNA استخراج شده از ژل الکتروفوروز استفاده گردید. جهت استخراج RNA ابتدا به بافت ۲۴ بیضه ۳۰۰-۲۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن در دمای ۸۰-درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرسملر خرد کرده، سپس کمی آن را پیپتاژ گردید. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلول‌ها در تماس بود. پس از ۱ دقیقه محلول را با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد: قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود. قسمت وسطی لوله که سفید رنگ و محتوی بافت لیز شده بود. قسمت پایینی لوله که صورتی و حاوی کیازول بود. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده، قرار داده شد. پس ۱ سی‌سی ایزوپروپانول را بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. ایزوپروپانول شفاف بوده و نیز شفاف می‌باشد اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به وجود می‌آورند. پس از افزودن ایزوپروپانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی‌سی الكل ۷۰ اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی RNA کل از ۶۰ درجه قرار داده شد. همچنین جهت تهیه OligodtMWG-Biotech و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شرکت Germany Fermentas) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش PCR با استفاده SYBER PCR master mix Applied Biosystems از

شدن. پس از القا مدل در هر گروه موش‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم (۵ سر)، اندومتریوز (۵ سر)، اندومتریوز + ویتامین E (۵ سر)، اندومتریوز + تمرین (۵ سر)، اندومتریوز + تمرین + ویتامین E (۵ سر) تقسیم شدند. گروه کنترل اندومتریوز، دو هفته بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه (مدت ۸ هفته) باقی ماندند و گروه کنترل سالم به مدت ۸ هفته نگهداری شدند و گروه کنترل اندومتریوز + مکمل ویتامین E دو هفته بعد از ایجاد مدل شروع به دریافت مکمل به صورت روزانه و به شکل گواژه به میزان ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش تا پایان مطالعه به مدت ۸ هفته نگهداری شدند. موش‌های صحرایی گروه‌های اندومتریوز + تمرین هم، دو هفته بعد از ایجاد مدل، قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به مدت مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی‌ها با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار می‌گرفتند. سپس ۵ روز در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد $100 \times 50 \times 50$ درجه سانتی گراد سانتی‌متری با درجه حرارت ۳۰-۳۲ در میان تمرین در طی ۸ هفته به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود. جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه‌بردای از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلزین (۵-۳ میلی گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس کشته شدند و پس از کشتار بافت تخدمان جهت بررسی مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۱). برای این منظور مربوط به بررسی بیان ژن به تانک ازت منتقل شدند. برای بررسی بیان ژن‌های ESR و IGFBP1 در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از تکنیک RT-qPCR جهت تایید بیان ژن‌های مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن (CinnaGen) استخراج شد و

توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و برای تعیین تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. سپس با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده‌ها از آزمون پارامتریک شامل آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری $p \leq 0.05$ برای بررسی تغییرات بیان ژن ESR و IGFBP1 استفاده شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار GraghPad Prism 8 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج جدول ۱ بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بیان ژن ESR در بین گروه‌های مختلف پژوهش است ($p < 0.0001$). مقایسات بین گروهی نیز نشان داد که بین گروه اندومتریوز+تمرين، با گروه‌های اندومتریوز+ویتامين E و اندومتریوز+تمرين+ویتامين E ($p = 0.1914$)، ($p = 0.9094$)، به ترتیب) و نیز بین گروه اندومتریوز+ویتامين E با اندومتریوز+تمرين+ویتامين E ($p = 0.2325$) تفاوت معنی‌داری در بیان ژن ESR نبود (شکل ۱). اما اختلاف معنی‌داری میان گروه اندومتریوز با گروه‌های اندومتریوز+تمرين، اندومتریوز+ویتامين E و اندومتریوز+تمرين+ویتامين E مشاهده گردید ($p = 0.0016$ ، $p = 0.026$ ، $p = 0.0335$ ، به ترتیب، شکل ۱). همچنین نتایج جدول ۱ تفاوت معنی‌داری در بیان ژن IGFBP1 در گروه‌های مختلف نشان داده شده است ($p < 0.0001$). تفاوت معنی‌داری در بیان ژن IGFBP1 بین گروه اندومتریوز+ویتامين E با گروه‌های اندومتریوز و اندومتریوز+تمرين نبود ($p = 0.1697$)، ($p = 0.3044$)، به ترتیب، شکل ۲. اما اختلاف معنی‌داری میان گروه اندومتریوز با گروه‌های اندومتریوز+تمرين و اندومتریوز+تمرين+ویتامين E و نیز بین گروه‌های اندومتریوز+تمرين+ویتامين E با گروه‌های اندومتریوز+تمرين و اندومتریوز+ویتامين E مشاهده گردید ($p = 0.0019$)

Applied Biosystems, Sequences ABI Step) DetectionSystems . Foster City, CA (One) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دمای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند.

نمودار Melting PCR جهت بررسی صحت واکنش‌های انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (CT Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول زیر:

$$\begin{aligned} R &= 2^{-(\Delta\Delta CT)} \\ \Delta\Delta CT &= (CT_{target} - CT_{reference})_{Time X} \\ &\quad - (CT_{target} - CT_{reference})_{Time 0} \end{aligned}$$

منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل ۵ غلظت لگاریتمی به ترتیب رقیق شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم گردید. میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

$$\begin{aligned} \text{Ratio} &= \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}}}{(E_{reference})^{\Delta CT_{reference}}} \\ (\Delta CT_{reference}) &= Ct_{control} - Ct_{treatment} \quad \Delta CT_{target} \\ &= Ct_{control} - Ct_{treatment} \end{aligned}$$

در فرمول فوق E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید (۲۳). بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌های بافتی، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار

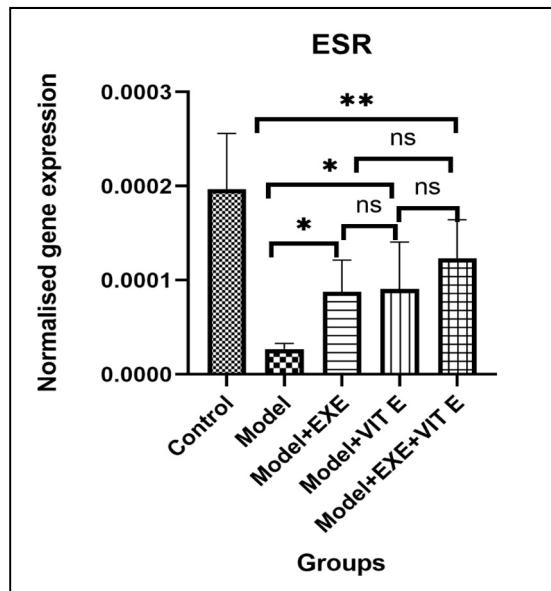
جدول ۱- نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه برای میزان بیان ژن‌های ESR و IGFBP1

			آماره
p	df	F	ESR
*<0.0001	(۴، ۲۰)	۱۰/۸۷	بیان ژن ESR
*0.0001	(۴، ۲۰)	۱۰/۳۴	IGFBP1

بحث و نتیجه گیری

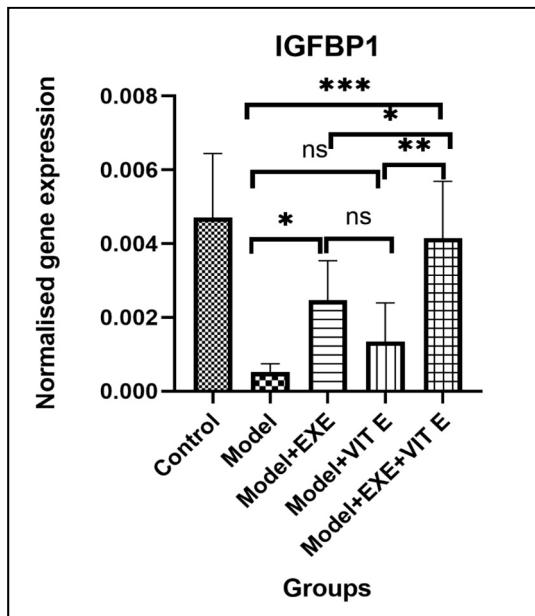
در تحقیق حاضر تأثیر یک دوره برنامه تمرین شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین E بر بیان ژن IGFBP1 و ESR در موش‌های مدل اندومتریوز مورد

۲. به ترتیب، شکل p=۰/۰۴۴۶, p=۰/۰۰۰۲, p=۰/۰۲۲۲.



شکل ۱ - مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن ESR که به وسیله Real time PCR مشخص شد.

گروه کنترل-سالم (Control)، گروه اندومتریوز (Model)، گروه اندومتریوز+تمرين (Model+EXE)، گروه اندومتریوز+ویتامین E (Model+VIT E)، اندومتریوز+تمرين+ویتامین E (Model+EXE+VIT E). تفاوت معنی‌داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن ESR در گروه‌های با علامت * وجود داشت (****: p<0.0001; **: p=0.0001; **: 0.0001<p<0.05; ns: no significant).



شکل ۲ - مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن IGFBP1 که به وسیله Real time PCR مشخص شد.

گروه کنترل-سالم (Control)، گروه اندومتریوز (Model)، گروه اندومتریوز+تمرين (Model+EXE)، گروه اندومتریوز+ویتامین E (Model+VIT E)، اندومتریوز+تمرين+ویتامین E (Model+EXE+VIT E). تفاوت معنی‌داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن IGFBP1 در گروه‌های با علامت * وجود داشت (****: p<0.0001; **: p=0.0001; **: 0.0001<p<0.05; ns: no significant).

تحریک شده است (۱۳). بنابراین غلظت IGFBP1 در گرددش منعکس‌کننده ترکیب اثر مهارکنندگی انسولین، درجه حساسیت به انسولین کبدی و عملکردهای تحریکی مختلف است (۱۵). افزایش IGFBP1 در اثر ورزش، ممکن است در پاسخ به کاهش سطح انسولین و گلوکز خون باشد. هاپکینز و همکاران در مطالعات خود نقش IGFBP1 را در زمان ورزش و واکنش آن در پاسخ به ورزش طولانی‌مدت مورد بررسی قرار دادند. برخلاف انتظار، اگرچه سرعت افزایش IGFBP1 کاهش یافت، اما افزایش معنی‌داری در حدود ۵ برابر در مقدار IGFBP1 مشاهده شد. آن‌ها چنین استنباط کردند که ورزش به تنها یی و جدا از انسولین و گلوکز، قادر است ترشح IGFBP1 را تنظیم کند (۲۹). به علاوه این فرض نیز وجود دارد که زمان ورزش، IGFBP1 ممکن است قبل از آنکه فعالیت IGF-I متوقف شود، با عمل خود حمل IGF-I را به عضله تسهیل کند و این کار موجب افزایش تحریک IGF-I برای دریافت گلوکز گردد. به هر حال، نتایج چندین مطالعه در شرایط آزمایشگاهی نشان داده که IGFBP1 می‌تواند فعالیت IGF-I را در سطح سلولی افزایش دهد (۳۰). طی فعالیت ورزشی، به نظر می‌رسد عامل بازدارنده ترشح IGFBP1 به دلیل کاهش سطح انسولین و گلوکز از بین می‌رود و این مسئله موجب افزایش سطح IGFBP1 می‌شود (۱۹). تغییر در سطوح در گرددش IGFBP1 نیز ممکن است در تغییرات دسترسی IGFs در طول تمرین و فعالیت ورزشی دخیل باشد (۱۸). تصور می‌شود IGFBP1 تعديل‌کننده‌ی عمدی دسترسی Zیستی IGF-I در دوره‌های کوتاه باشد و به‌وسیله چندین عامل شامل انسولین، گلوکوکورتیکوئیدها، عوامل دارای اثرات موفق cAMP و GH تنظیم می‌شود (۳۰). IGFBP1 در پاسخ به فعالیت هوازی زیاد دور از انتظار نبود، چرا که این جزء از دستگاه IGF-I بیشتر به واسطه بهم‌ریختگی‌های سوخت و سازی که جریان یا تعادل انرژی را دگرگون می‌سازند، تحت تأثیر قرار می‌گیرد. گاهی فعالیت‌های طولانی چند ساعته یا دوره‌های چند روزه از فعالیت، نیاز است تا پاسخ IGFBP1 ظاهر شود. با این حال تغییر در غلظت‌های این پروتئین در پاسخ به فعالیت ورزشی گزارش شده است (۲۵). از سوی دیگر اغلب تحقیقاتی که نوسانات سطوح IGFBP1 را به دنبال فعالیت ورزشی

بررسی قرار گرفت. از نتایج مهم تحقیق حاضر کاهش معنادار سطوح ESR و IGFBP1 موش‌های مدل اندومتریوز نسبت به گروه سالم می‌باشد که مداخله ورزش سطح آن افزایش معنادار نسبت به گروه بیمار داشت. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برخی از محققین که در تحقیق خود اظهار داشتند بیماری آندومتریوز منجر به تغییر بیان ژن خانواده ESR و IGFBP1 می‌گردد، همسو است (۲۴ و ۲۵). همچنین برخی از مطالعات که نشان دادند که انجام فعالیت بدنی منجر به افزایش سطح بیان ژن ESR و IGFBP1 می‌شود، هم‌راستا می‌باشد (۲۶ و ۲۷).

ژن ESR روی بازوی بلند کروموزوم ۶ قرار دارد و حاوی ۸ اگزون است. محصول این ژن، ایزوفرم α از ایزوفرم‌های معروف گیرنده‌های استروژن است. این گیرنده به عنوان فاکتورهای رونویسی داخل هسته‌ای از طریق تنظیم بیان انواعی از ژن‌ها از جمله ژن‌های دخیل در بلوغ و تکامل اندام‌های تولید مثلی در کنترل فرایند مسیر پیچیده زیستی نقش ایفا می‌کند (۲۴). این ژن به عنوان یکی از پلی‌مورفیک‌ترین ژن‌ها شناخته شده است، به طوری که در مطالعات انجام شده بیش از ۲۰۰ پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی از این ژن گزارش شده است (۲۷). مطالعه این ژن و گیرنده‌های استروژن موضوع مهمی است که به ایجاد روش‌های درمانی کارآمد برای بیماری‌های رحمی کمک می‌کند. اسمیت و همکاران نقش پلی‌مورفیسم ژن در ESR ایجاد مقاومت به استروژن و کاهش تراکم استخوان را گزارش کردند و اظهار داشتند که تغییر در کیفیت زندگی از جمله پرداختن فعالیت‌های بدنی، کنترل تغذیه بر روی این ژن اثرگذار است (۲۸)، چرا که دیگر محققان مانند لیو و همکاران این ژن را به عنوان یک فاکتور مهم در استعداد به بیماری‌های التهابی و نایلاروری معرفی کردند (۲۴). ایزوفرم α این گیرنده در اکثر بافت‌های بدن حضور دارد و بیان بیشتر آن در بافت‌های تولید مثلی پس فعالیت بدنی نشانگر بهبود وضعیت بیماری‌های مرتبط با رحم دارد (۲۷). از سوی دیگر، IGFBP1 در درجه اول از سلول‌های کبدی ترشح می‌شود جایی که سنتز توسط انسولین مهار شده و توسط چند تنظیم‌کننده از جمله گلوکاگن، استروژن، گلوکوکورتیکوئیدها و سایتونکین‌های پیش‌التهابی

تغییرات پاتولوژیکی می‌شود که در پاسخ به نفوذ سلول‌های التهابی ایجاد می‌شود (۳۲). ویتامین E چون خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد بعد از تمرینات ورزشی باعث بازسازی سریع سلول‌های تخریب شده از ورزش می‌شود و باعث می‌شود که بدن انسان بتواند مواد مغذی حل شده در چربی را جذب کند و باعث گشادی رگ‌ها شده و منجر به روان کردن جریان خون گردد. این تصور وجود دارد که افزایش در ESR و IGFBP1 پس از فعالیت ورزشی به همراه مصرف ویتامین E ممکن است به واسطه اتصال به آزاد پلاسمای باشد (۳۴). برای همین، این فرضیه که افزایش سطح این ژن‌ها در طول فعالیت ورزشی به همراه مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش در محتوای گلیکوزن کبدی مرتبط است را مطرح ساختند، زیرا این ویتامین دارای آنتی‌اکسیدان‌هایی است که با تقویت سیستم ایمنی بدن انسان، مقاومت در برابر بیماری‌های التهابی را افزایش می‌دهند. این فرضیه توضیح می‌دهد که چرا علی‌رغم حفظ سطوح قندخون و عدم تغییر در مقادیر انسولین متعاقب فعالیت ورزشی و مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها سطوح برخی ژن‌ها مانند IGFBP1 افزایش می‌یابد (۴۴). با توضیحاتی که گذشت، تغییر در بیان این ژن‌ها که پس از فعالیت هوایی شنا به همراه مصرف ویتامین E مشاهده شد، قابل توجیه به نظر می‌رسد. با این وجود تنافق در یافته‌ها می‌تواند ریشه در تفاوت‌های گروه مطالعه، طول دوره‌ی تمرین، شدت، مدت و نوع تمرین و نیز دُرْ مصرفی و نوع ویتامین داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهند که عواملی مثل تغذیه، مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها، استرس، بیماری‌ها، شرایط محیطی بر اندومنتریوز تأثیر فراوان دارند (۹، ۱۰ و ۳۳). لذا با توجه به اینکه بررسی مسیرهای مولکولی متعدد در این پژوهش امکانپذیر نبود، برای نتیجه گیری قاطع درباره ای آثار تمرین و ویتامین E بر این شاخص‌ها انجام مطالعات بیشتر ضروری است.

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که تغییر مولکول‌های کلیدی یا مسیرهای سیگنالی و بیان ژن در فرایند آندومتریوز می‌تواند باعث بهبود سطح این بیماری گردد و انجام فعالیت ورزشی منظم هوایی و نیز مصرف هم‌زمان ویتامین E در مهار این بیماری و بهبود سطح این بیماری کمک شایانی می‌کند.

گزارش کرده‌اند از فعالیت‌های طولانی یا تلفیق شده با فشارهای سوخت‌وسازی (مثل محدودیت یا محرومیت غذایی) استفاده نموده‌اند (۲۶). بر این اساس، می‌توان استنباط کرد که وضع تغذیه‌ی و شرایط سوخت‌وسازی بیان IGFBP1 را مستقل از فعالیت ورزشی تنظیم می‌کنند. احتمالاً IGFBP1 از برهم کنش IGF-I با گیرنده‌های نوع I در عضله پس از فعالیت ورزشی جلوگیری می‌کند و از این طریق در تنظیم قندی درگیر است (۱۸). فعالیت ورزشی هوایی به پاسخ اجزای ترکیبی دستگاه IGF-I منجر می‌شود که به شکل تغییر در غلظت‌های آن قابل اندازه‌گیری و مشاهده است؛ اما این پاسخ بسته به سطح آمادگی می‌تواند هم در جهت و هم در اندازه بین افراد مختلف متفاوت باشد. به علاوه، شدت فعالیت ورزشی عامل تعیین‌کننده‌ای برای تحریک پاسخ جزء‌جهة این شبکه و بزرگی آن است. مضاف بر این که گاهی برای رؤیت تغییرات قابل توجه برخی از اجزای این دستگاه (مثل IGFBP1) لازم است فعالیت ورزشی به اندازه کافی طولانی باشد تا پاسخ فیزیولوژیک تحریک گردد (۱۸).

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که یک دوره برنامه تمرینی شنا با شدت پایین به همراه مصرف ویتامین E منجر به افزایش سطح ESR و IGFBP1 است و بیمار گردید. گیامپولینو و همکاران در یک مطالعه مروری به بررسی ارتباط بین ویتامین‌ها و بیماری آندومتریوز پرداختند و نشان دادند که بین گروه ویتامین‌ها و بهبودی بیماری آندومتریوز رابطه مستقیمی برقرار است و ویتامین خانواده گروه E منجر به تسکین درد و بهبود ضایعه آندومتریوتیک در مدل-های آزمایشگاهی و کاهش علایم این بیماری می‌شود (۳۱). تحقیقات نشان دادند که رژیم غذایی سرشار از میوه‌ها، سبزیجات و دانه غلات در پیشگیری از رشد و متاستاز آندومتریوز نقش دارند (۳۲). ویتامین E نقش مهمی در پیشگیری و درمان آن از طریق تعدیل مسیرهای سیگنالی سلولی دارد (۳۳). ویتامین E عامل ضد التهابی قوی و ضد جهش و تقویت‌کننده عصب شناخته شده است (۳۱) که از طریق فعال‌سازی ژن سرکوب‌کننده تومور، غیرفعال‌سازی رگ‌زایی و فعال‌سازی ژن ضد التهابی و القاء آپوپتوz موجب مهار پیشرفت تومورهای این بیماری و مانع بسیاری از

Kubo M, Akahane T, et al. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):707.

10. Razzi S, Fava A, Sartini A, De Simone S, Cobellis L, Petraglia F. Treatment of severe recurrent endometriosis with an aromatase inhibitor in a young ovariectomised woman. *Int J Obstet Gynecol*. 2004 Feb;111(2):182-4.

11. Xie J, Wang S, He B, Pan Y, Li Y, Zeng Q, et al. Association of estrogen receptor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms with endometriosis in a Chinese population. *Fertil Steril*. 2009 Jul 1;92(1):54-60.

12. Braundmeier AG, Fazleabas AT. The non-human primate model of endometriosis: research and implications for fecundity. *Mol Hum Reprod*. 2009 Jul 24;15(10):577-86.

13. Lewitt MS, Hilding A, Brismar K, Efendic S, Östenson CG, Hall K. IGF-binding protein 1 and abdominal obesity in the development of type 2 diabetes in women. *Eur J Endocrinol*. 2010 Aug 1;163(2):233-42.

14. Lewitt MS, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-1: a role in glucose counterregulation? *Mol Cell Endocrinol*. 1991 Aug 1;79(1-3):C147-52.

15. Hamon GA, Hunt TK, Spencer EM. In vivo effects of systemic insulin-like growth factor-I alone and complexed with insulin-like growth factor binding protein-3 on corticosteroid suppressed wounds. *Growth Regul*. 1993 Mar;3(1):53-6.

16. Koziris LP, Hickson RC, Chatterton Jr RT, Groseth RT, Christie JM, Goldflies DG, et al. Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *J Appl Physiol*. 1999;86(4):1436-42.

17. Manetta J, Brun JF, Maïmoun L, Féodou C, Préfaut C, Mercier J. The effects of intensive training on insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins 1 and 3 in competitive cyclists: relationships with glucose disposal. *J Sports Sci*. 2003 Jan 1;21(3):147-54.

18. Poehlman ET, Rosen CJ, Copeland KC. The influence of endurance training on insulin-like growth factor-1 in older individuals. *Metabolism*. 1994;43(11):1401-5.

19. Rosendal L, Langberg H, Flyvbjerg A, Frystyk J, Ørskov H, Kjær M. Physical capacity influences the response of insulin-like growth factor and its binding proteins to training. *J Appl Physiol*. 2002;93(5):1669-75.

20. Vercellini P, Eskenazi B, Consonni D, Somigliana E, Parazzini F, Abbiati A, et al. Oral contraceptives and risk of endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010 Sep 10;17(2):159-70.

21. Kiani K, Movahedin M, Malekafzali H,

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. بدین‌وسیله نویسنده‌گان تشکر خود را از تمامی کسانی که در پیشبرد اهداف رساله یاری نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

تأثیردهیه اخلاقی

پژوهشگران کلیه قوانین اخلاقی مرتبط با تحقیقات بر روی حیونات را رعایت نمودند.

References

1. Nisenblat V, Bossuyt PM, Farquhar C, Johnson N, Hull ML. Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2.
2. Fang J, Piessens S. A step by step guide to sonographic evaluation of deep infiltrating endometriosis. *Sonography*. 2018 Jun;5(2):67-75.
3. Hirsch M, Duffy JM, Davis CJ, Nieves Plana M, Khan KS. Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 for endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obstetr Gynaecol*. 2016 Oct;123(11):1761-8.
4. Clarkson J. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Front Neuroendocrinol*. 2013 Apr 1;34(2):120-31.
5. Astessiano AL, Carriquiry M, Mattiauda DA, Adrien ML, Chilibroste P, Meikle A. Endometrial gene expression in primiparous dairy cows at the end of the voluntary waiting period is affected by nutrition: Total mixed ration vs increasing levels of herbage allowance. *Reprod Domest Anim*. 2017 Oct;52(5):798-805.
6. Darabi M, Ani M, Panjehpour M, Rabbani M, Movahedian A, Zarean E. Effect of estrogen receptor β A1730G polymorphism on ABCA1 gene expression response to postmenopausal hormone replacement therapy. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 Jan 1;15(1-2):11-5.
7. Hewitt KN, Boon WC, Murata Y, Jones ME, Simpson ER. The aromatase knockout mouse presents with a sexually dimorphic disruption to cholesterol homeostasis. *Endocrinology*. 2003 Sep 1;144(9):3895-903.
8. Danilovich N, Babu PS, Xing W, Gerdes M, Krishnamurthy H, Sairam MR. Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) female mice. *Endocrinology*. 2000 Nov 1;141(11):4295-308.
9. Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, Takahashi A,

- Mirfasihi F, Sadati SN, Moini A, et al. Effect of the estrus cycle stage on the establishment of murine endometriosis lesions. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2018;16(5):305-14.
22. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, editors. Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993.
23. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res*. 2001 May 1;29(9):e45-.
24. Liu L, Tan R, Cui Y, Liu J, Wu J. Estrogen receptor α gene (ESR1) polymorphisms associated with idiopathic premature ovarian failure in Chinese women. *Gynecol Endocrinol*. 2013 Feb 1;29(2):182-5.
25. Eliakim A, Nemet D, Zaldivar F, McMurray RG, Culler FL, Galassetti P, et al. Reduced exercise-associated response of the GH-IGF-I axis and catecholamines in obese children and adolescents. *J Appl Physiol*. 2006 May;100(5):1630-7.
26. Manetta J, Brun JF, Maïmoun L, Férou C, Préfaut C, Mercier J. The effects of intensive training on insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins 1 and 3 in competitive cyclists: relationships with glucose disposal. *J Sports Sci*. 2003 Jan 1;21(3):147-54.
27. Anousha N, Hossein-Nezhad A, Biramijamal F, Rahmani A, Maghbooli Z, Aghababaei E, et al. Association study of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with spontaneous abortion: is this a possible reason for unexplained spontaneous abortion?. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
28. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*. 1994 Oct 20;331(16):1056-61.
29. Hopkins NJ, Jakeman PM, Hughes SC, Holly JM. Changes in circulating insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) during prolonged exercise: effect of carbohydrate feeding. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Dec 1;79(6):1887-90.
30. Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. 2000 Feb 4;86(2):125-30.
31. Giampaolino P, Corte LD, Foreste V, Bifulco G. Is there a relationship between Vitamin D and endometriosis? An Overview of the Literature. *Curr Pharm Des*. 2019 Jun 1;25(22):2421-7.
32. Cramer DW, Wilson E, Stillman RJ, Berger MJ, Belisle S, Schiff I, et al. The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *JAMA*. 1986 Apr 11;255(14):1904-8.
33. Dhillon PK, Holt VL. Recreational physical activity and endometrioma risk. *Am J Epidemiol*. 2003 Jul 15;158(2):156-64.
34. Anthony TG, Anthony JC, Lewitt MS, Donovan SM, Layman DK. Time course changes in IGFBP-1 after treadmill exercise and postexercise food intake in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Apr 1;280(4):E650-6.